



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑦1 Aktenzeichen: P 33 41 367.3  
⑦2 Anmeldetag: 15. 11. 83  
④3 Offenlegungstag: 24. 5. 84

G 01 N 33/54 F

DE 3341367 A1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
16.11.82 JP P200730-82

⑦1 Anmelder:  
Taniguchi, Masaru, Chiba, JP

⑦2 Vertreter:  
Wilhelms, R., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Kilian, H.,  
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑦2 Erfinder:  
Taniguchi, Masaru; Wakabayashi, Seiji, Chiba, JP

⑤4 Melanomdiagnosemittel mit Gehalt an monoklonem spezifischen Antikörper

Mittel zur Diagnose von Melanom bei Menschen, das einen monoklonen Antikörper wie M2590 Antikörper enthält, der geeignet ist, ein Säugetieren eigenes Melanomantigen anzuzeigen, Diagnoseausstattungen, bei denen das genannte Reagenz verwendet wird, sowie Immunoassays zum Auffinden von Melanomantigen.

DE 3341367 A1

3. Komponente einer Diagnoseausstattung zur Erkennung von menschlichem Melanom, die in Form einer Festkörperphase vorliegt, an der ein monoklonaler Antimelanomantikörper angeordnet ist, der fähig ist, ein Säugetieren eigenes Melanomantigen zu erkennen.

4. Komponente nach Anspruch 3, bei der die Festkörperphase einen Träger aufweist, an oder in dem ein Immunoassay ausgeführt werden kann.

5. Komponente nach Anspruch 3, wobei der monoklonale Antikörper M2590 Antikörper ist.

6. Komponente nach Anspruch 4, wobei der monoklonale Antikörper M2590 Antikörper ist.

7. Reagenz nach Anspruch 1, wobei der Markierungsanteil ein bei Immunoassays verwendeter Markierungsanteil ist.

8. Reagenz nach Anspruch 7, in dem der Markierungsanteil ein radioaktives Element ist.

9. Reagenz nach Anspruch 8, in dem der Markierungsanteil ein Enzym ist.

10. Diagnoseverfahren zur Auffindung der Anwesenheit von Melanom bei einem Menschen, wobei ein monoklonaler Antimelanomantikörper, der fähig ist, ein Säugetieren eigenes Melanomantigen zu erkennen, mit einem Extrakt von Gewebe oder Zellen des betreffenden Menschen, in denen Melanomzellen vermutet werden, ausbrütet und die Menge des genannten Antikörpers bestimmt wird, die mit in dem besagten Extrakt anwesenden Antigenen reagiert.

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Reagenz zur Verwendung für die Melanomdiagnose, wobei das Reagenz einen monoklonen Antimelanomantikörper enthält, der ein Säugetieren eigenes Melanomantigen erkennt. Die Erfindung betrifft  
5 ebenfalls Diagnoseverfahren zur Auffindung von Melanomen (Melanomkarzinomen, -sarkomen), wobei das genannte Reagenz verwendet wird.

Erfindungsgemäß wurde auf einem T-Zellenspiegel (T cell level) die Existenz eines melanomspezifischen Antigens, das verschiedene Tierarten eigen ist, gefunden, das auf der Oberfläche von Melanomzellen ausgebildet ist (Nature, 294,  
10 748-750, 1981).

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Diagnosereagenz zur Verfügung zu stellen, das einen  
15 monoklonen Antimelanomantikörper enthält.

Aufgabe der Erfindung ist ebenfalls, einen monoklonen Antimelanomantikörper zur Verfügung zu stellen, der nicht artenspezifisch ist.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Diagnoseausstattung (Diagnosekit) zur Verfügung zu stellen, die als ein Reagenz  
20 einen monoklonen Antimelanomantikörper enthält.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, Diagnoseverfahren zum Auffinden von Melanomen bei Säugetieren, insbesondere Menschen, zur Verfügung zu stellen, bei denen ein nicht artenabhängiger monokloner Antimelanomantikörper verwendet  
25 wird.

Andere vorzugsweise Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung.

Erfindungsgemäß wird (1) ein Reagenz zur Verwendung  
30 bei der Diagnose von Melanomen bei Menschen zur Verfügung gestellt, das einen monoklonen Antikörper enthält, der geeignet ist, ein Säugetieren eigenes Melanomantigen zu erken-

stellung durch Immunisierung mit Mausmelanom reagiert er nicht nur mit Mausmelanom sondern ebenso mit Melanomen von anderen Lebewesen wie menschlichen und Hamstermelanomen. Es wurde jedoch gefunden, daß der monoklone Antikörper eine  
5 solche Spezifität aufweist, daß er in keinem Fall mit Neuroblastom, Myelom, Fibrosarcom, schuppenförmigen Zellcarcinom, Akanthom, Zervikalcarcinom und Lymphom oder mit normalen Geweben (von der Haut, Augen, Cerebrum, usw.) von Menschen und Mäusen reagiert.

10 Die biochemische Analyse hat gezeigt, daß das menschliche oder Mäusemelanomantigen ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 31.000 ist. Insbesondere haben Experimente mit der Behandlung mit Exoglycosidase und Behandlung mit Tunicamycin zu der Entdeckung geführt, daß die  
15 Antigenwirkung, die durch den monoklonen Antimelanomantikörper gemäß Vergleichsbeispiel (als "M2590 Antikörper" bezeichnet) erkannt wird, asparagingebundene Zuckerketten mit endständigen Speichelsäuren (sialic acid) ist.

Im allgemeinen erkennt ein monokloner Antikörper nur  
20 eine Antigen determinante von Antigenmolekülen. Ist eine spezifizierte Antigen determinante ein Protein, ist nur eine solche Determinante an einem Molekül vorhanden. Demnach kann nur ein Molekül des monoklonen Antikörpers mit einem Antigenmolekül kombiniert werden. Jedoch erkennt der erfindungsgemäße monoklone Antikörper ein Tumorantigen, das  
25 aus Zuckerketten zusammengesetzt ist. Das heißt, daß viele Zuckerketten an einem Antigenmolekül vorhanden sind, und daß deshalb viele Antikörpermoleküle mit einem Antigenmolekül kombinieren können. Entsprechend sollte der monoklone Antikörper gemäß Erfindung mit seiner hochspezifischen Reaktivität hohe Sensitivität aufweisen, wenn er als  
30 diagnostisches oder therapeutisches Mittel verwendet wird.

Da, wie zuvor erwähnt, der erfindungsgemäße monoklone Antikörper, wie der M2590 Antikörper, gleichwertig mit  
35 nicht-menschlichen tierischen Melanomzellen und mensch-

Zentrifugenrohr eingegeben und 10 Minuten bei Zimmertemperatur und 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und der Rückstand in ein konstantes Temperaturbad bei 37°C eingebracht. Während die Zellen langsam mit der Spitze einer Pipette vermischt wurden, wurde  
5 1 ml einer erhitzten 50 %igen Polyäthylenglycol (PEG) Lösung langsam über einen Zeitraum von 1 Minute zugegeben. Für eine weitere Minute wurde die Suspension mit der gleichen Pipette gerührt. Dann wurden langsam 2 ml erhitzter RPMI-1640 unter  
10 Rühren über einen Zeitraum von 2 Minuten zugesetzt. Zusätzlich wurden über 2 bis 3 Minuten 7 ml RPMI-1640 zugegeben. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 10 ml RPMI-1640 mit Gehalt an 10 % Kalbfetusserum versetzt.  
15 Die Mischung wurde leicht gerührt. Die Zellsuspension wurde schrittweise in einer Menge von 0,1 ml je Ausnehmung auf eine flachbödige Mikrottestplatte mit 96 Ausnehmungen aufgegeben und in einem Kohlendioxidinkubator kultiviert.

### (3) Untersuchungen

20 Am nächsten Tag nach Beginn der Kultivierung wurde 0,1 ml HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Kulturfluid zugesetzt; nach Ablauf von 2, 3, 5, 8 und 11 Tagen wurde eine Hälfte des Überstands in jeder Ausnehmung abgezogen und 0,1 ml frischen HAT-Kulturfluids zugesetzt. Dann wurde das  
25 Kulturmedium mit HT (Hypoxanthin, Thymidin)-Kulturfluid alle 3 oder 4 Tage ausgetauscht.

Als Zielzellen (target cells) wurden (1) B16 Mausmelanomzellen, (2) menschliche Melanomzellen und (3) EL-4 Lymphomazellen von C57BL/6 Mäusen verwendet.  $5 \times 10^5$  der Zielzellen wurden mit  
30 50 µl der überstehenden Kulturflüssigkeit des Hybridoma (einschließlich des Antikörpers) bei 0°C für 50 Minuten umgesetzt. Die Reaktion wurde auf einer Mikrotiterpolystyrolplatte mit 96 Ausnehmungen (hergestellt von Dynatech Lab. Co.) durchgeführt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren gewaschen und mit 50 µl Antimaus-Ig Antikörper  
35

## (5) Reinigung des Antikörpers

1 x 10<sup>8</sup> Hybridomazellen wurden intraperitonäal jeder von (BALB/C x C57BL/6) F<sub>1</sub> Mäusen verabreicht; nach 10 Tagen wurde der Ascites, der den Antikörper enthielt, gesammelt. 5 10 ml Ascites wurden zentrifugiert, in ein Dialyserohr eingegeben und gegen 0,001M Phosphatpuffer (pH 6,5) für 48 Stunden dialysiert. Auf diese Weise konnten alle monoklonen Antikörper abgetrennt werden. Der abgetrennte monoklone Antikörper wurde in einer geringen Menge von 3 %iger NaCl-Lösung gelöst und gegen 0,1 M Phosphat/Natriumchlorid- 10 puffer (pH 7,2) dialysiert. Als Ergebnis konnten die meisten der anderen Proteine zusammen mit dem Überstand entfernt werden. Durch zwei- bis dreimaliges Wiederholen dieses Vorgangs wies der monoklone Antikörper eine Reinheit 15 von mehr als 95 % auf. Die Immunglobulinklassen der M2590 und M562 Antikörper war IgM; darüber hinaus waren es Euglobuline.

Die Melanomantikörper, die wie zuvor beschrieben erhalten wurden, können als ein Melanomdiagnosemittel, beispielsweise in Form einer Lösung verwendet werden. 20

Das folgende Beispiel beschreibt eine Methode zum Diagnostizieren von Melanom unter Verwendung des erfindungsgemäßen Melanomdiagnosemittels.

25 Beispiel

## (1) Immuncassay in der Festphase

Es wurde eine Lösung von gereinigtem M2590 Antikörper (gereinigt durch isoelektrische Abscheidung) in einer Konzentration von 2 mg/ml hergestellt, wobei 0,1M Phosphat/ 30 Natriumsalzpuffer (pH 7,2) verwendet wurde. 60 µl der Antikörperlösung wurden je Ausnehmung auf eine 96 Ausnehmungen enthaltende Polystyrolplatte (hergestellt durch Dynatech Lab. Co.) in □-Form zugegeben und bei Zimmertemperatur über einen Zeitraum von einer Stunde umgesetzt. Dann wurde 35 0,5% Rinderserum Albumin (BSA) zugesetzt und die Platte drei-

Melanom-(B16)-Zellen oder menschlichen Melanomzellen (P-39) gemäß dem Verfahren, wie es in den letzten beiden Paragraphen des Abschnitts (1) zuvor beschrieben wurde, hergestellt. Die gebildeten Tumorzellenextrakte unterschiedlicher  
5 Antigenkonzentrationen wurden zu dem in (1) beschriebenen Immunoassaysystem zugegeben und geprüft. Das Ergebnis, wie es in Fig. 2 abgebildet ist, ist derart, daß, wenn ein Extrakt entsprechend  $10^6$ /ml Tumorzellen schrittweise auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt wurde, die Auffindung  
10 bei einer Konzentration von  $10^5$ /ml und mehr nahezu linear abfiel, wobei das Minimum zur Auffindung  $10^3$ - $10^2$ /ml betrug.

Diese experimentellen Ergebnisse zeigen, daß der Immunoassay in Festphase unter Verwendung dieses Antikörpers  
15 (M2590) sehr genau ist und die Auffindung sehr geringer Mengen an Melanomantigen ermöglicht.

(3) Spezifizität des Immunoassays in der Festphase  
Um die Spezifizität der Festphasenimmunoassay-Methode zu prüfen, wurden Tumorentigenextrakte gemäß (1) aus drei Arten  
20 von menschlichen Melanomzellen (P-36, P-39, P-22), Hamstermelanomzellen, zwei Arten von Mausmelanomzellen (B-16, S-91) menschlichen Cervicalcarcinom (Hela), chirurgisch resezierten Fragmenten von einem Melanopatienten (menschlich, zwei Fälle), menschlicher Hautkrebs (schuppenförmiges Zellcarcinom) und resezierte Proben von Basalioma hergestellt.  
25 Diese Tumorentigenextrakte wurden dem Immunoassay in Festphase gemäß Abschnitt (1) unterworfen. Das Ergebnis gemäß Fig. 3 bestand darin, daß Extrakte von Melanomzellen, die von Menschen, Hamstern und Mäusen erhalten wurden, unabhängig davon, ob sie kultivierte Zellstränge oder chirurgisch resezierte Proben waren, durch Immunoassay aufgezeigt wurden; der Antikörper jedoch reagierte überhaupt nicht mit anderen Krebszellen als Melanomzellen, wie menschlichen Cervicalcarcinom, schuppenförmigen Zellkarzinom und Acanthoma.  
35 Die Ergebnisse werden in Fig. 3 wiedergegeben.

14  
Leerseite

Fig. 3

